

12

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: 84109067.3

51 Int. Cl.⁴: **C 07 K 7/40**

22 Anmeldetag: 01.08.84

30 Priorität: 03.08.83 DE 3327928

71 Anmelder: **HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT,**
Postfach 80 03 20, D-6230 Frankfurt am Main 80 (DE)

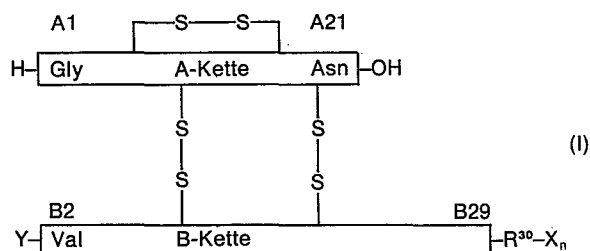
43 Veröffentlichungstag der Anmeldung: 03.04.85
Patentblatt 85/14

84 Benannte Vertragsstaaten: **AT BE CH DE FR GB IT LI LU**
NL SE

72 Erfinder: **Grau, Ulrich, Dr., Zell 17, D-6238 Hofheim am**
Taunus (DE)

54 **Verfahren zur Herstellung von Insulin-Derivaten.**

57 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Insulin-Derivaten der Formel I



in welcher

R³⁰ für den Rest einer neutralen, genetisch kodierbaren L-Aminosäure steht, X, für gleiche oder verschiedene Reste genetisch kodierbarer L-Aminosäure steht, darunter mindestens eine basische Aminosäure, wobei das C-terminale Glied Homoserinlacton sein kann, Y Phe oder H, n = 1, 2 oder 3 bedeutet, durch Spaltung von Intermediaten, Proinsulin, Präproinsulin oder deren Analogen, das dadurch gekennzeichnet, dass die Spaltreaktion in der Nähe des isoelektrischen Punktes der Insulin-Derivate der Formel I in Gegenwart einer aromatischen Hydroxyverbindung durchgeführt wird.

EP 0 135 720 A2

Verfahren zur Herstellung von Insulin-Derivaten

Insulin wird in vivo in Form eines Vorläufers, des Präproinsulins, synthetisiert. Die Präsequenz stellt eine
5 Signalregion für Wechselwirkungen mit Membranen dar und wird noch bei oder aber unmittelbar nach der Synthese abgespalten. Das Proinsulin hingegen ist ein Molekül, das in geringen Mengen in Pankreaseextrakten nachweisbar ist. Bei dessen Umwandlung zum Insulin wird durch ein spezifisches Enzym-
10 system das C-Peptid abgespalten.

Die Schnittstellen für die Prozessierungsenzyme werden gebildet durch die Sequenzen Arg-Arg an den Positionen B31 und B32 (B30 ist der spätere C-Terminus der B-Kette) und
15 Lys-Arg an der Position 62 (bzw. A 1) und 63 (bzw. A0), die sich N-terminal zu der späteren A-Kette befinden. Mit Enzymen mit tryptischer und Carboxypeptidase-B-Aktivität läßt sich in vitro Proinsulin glatt in Insulin umwandeln (Kemmler et al., JBC 246, 6786-91 (1971)). Die Proteolyse mit Trypsin
20 oder trypsin-ähnlichen Enzymen allein liefert hingegen bevorzugt jene Zwischenprodukte, die noch eines oder beide Arginine in den Positionen 31 und 32 am C-Terminus der B-Kette tragen, neben jenen Insulin-Abbauprodukten, die B-terminal zu Lysin-(B29) Insulin (=des-Alanin-(B30)-Schweine-
25 insulin, des-Threonin-(B30)-Humaninsulin) oder zu Arginin-(B22) -Insulin (=desoctapeptid-Insulin) gespalten sind (Chance, in Proc. VII Congress of International Diabetes Fed., (1970); D.E. Steiner et al., Fed. Proc. 33, 2105-15 (1974); J. Markussen in Proc. Symp. on Proinsulin, Insulin, C-Peptide,
30 Tokushima (1978)).

Durch gentechnologische Methoden sind heutzutage Präproinsuline aus Prokaryonten, insbesondere E. coli, zugänglich. Besonders interessant sind dabei solche Stämme, die Proin-
35 suline mit menschlicher Insulinsequenz enthalten. Durch

Abänderung der Plasmide ist es darüberhinaus möglich, gezielt neue Sequenzabschnitte zu konstruieren, insbesondere Änderungen an den Positionen 31-33 und 61-63 der Proinsulinsequenz in der Weise, daß enzymatische oder chemische

5 Spaltstellen zur Freisetzung von Insulin bzw. Insulinderivaten erhalten bleiben. Dazu zählen beispielsweise solche Derivate, die an Stelle eines oder beider Arginine an Position 31 und 32 eine andere basische Aminosäure, also Lysin oder Histidin, enthalten, so daß Enzyme mit tryptischer

10 Spezifität zur Spaltung herangezogen werden können. Es können aber auch Sequenzen eingeführt werden, die Substrate anderer bekannter proteolytischer Enzyme sind oder Sequenzen, an denen eine Spaltung mit chemischen Methoden möglich ist. Voraussetzung für die vorliegende Erfindung ist nur, daß bei

15 geeigneter Spaltung des Proinsulinanalogen ein Insulinderivat entsteht, das keine zusätzliche Aminosäure vor dem N-Terminus der A-Kette aufweist und unter den bis zu drei zusätzlichen Aminosäuren am C-Terminus der B-Kette (Positionen 31-33) mindestens eine basische Aminosäure

20 trägt.

Solche Insulinderivate die am C-Terminus der B-Kette zusätzlich positive Ladungen aufweisen, Verfahren zu deren Herstellung, diese enthaltende Mittel und deren Verwendung sind

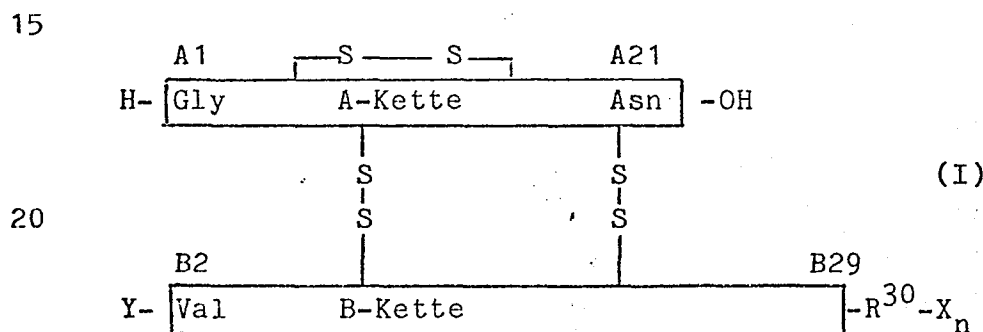
25 Gegenstand der deutschen Patentanmeldungen P 33 26 472.4 (HOE 83/F 141) und P 33 26 473.2 (HOE 83/F 142). Ein Verfahren zu ihrer Kristallisation ist Gegenstand der deutschen Patentanmeldung P 33 27 709.5 (HOE 83/F 148).

30 Es wurde nun gefunden, daß diese Insulinderivate besonders glatt aus den entsprechenden Intermediaten, Proinsulinen, Präproinsulinen oder den entsprechenden Analogen herstellbar sind, indem man die proteolytische Verdauung oder die chemische Spaltung in der Nähe des isoelektrischen Punktes des

- 3 -

gewünschten Derivats in Gegenwart von Phenol oder ähnlichen Aromaten durchführt. Es wird auf diese Weise nicht nur erreicht, daß das Endprodukt aus der Reaktionslösung ausfällt und somit weitgehend dem Reaktionsgleichgewicht entzogen wird; unter den beschriebenen Bedingungen entstehen direkt in dem Medium scharfkantige, prismenförmige Kristalle, die wegen der geringen Oberfläche einer Weiterreaktion viel weniger unterliegen als z.B. amorphe Niederschläge. So ist es beispielsweise erstaunlich, daß das Derivat Insulin-Arg^{B31}-OH in kristalliner Form gegen weiteren tryptischen Abbau außerordentlich stabil ist.

Die Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Herstellung von Insulin-Derivaten der Formel I,



in welcher

25 R^{30} für den Rest einer neutralen, genetisch kodierbaren L-Aminosäure steht,

X für gleiche oder verschiedene Reste genetisch kodierbarer L-Aminosäuren steht, darunter mindestens eine basische Aminosäure wobei das C-terminale Glied der Homoserinlactonrest sein kann,

30 Y = Phe oder H und

n = 1, 2 oder 3 bedeutet, durch Spaltung von Intermediaten, Proinsulin, Präproinsulin oder deren Analogen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die Spaltreaktion in der Nähe des isoelektrischen Punktes der Insulin-Derivate der Formel I in Gegenwart einer aromatischen Hydroxyverbindung durchgeführt wird.

35

Bevorzugt ist Y = Phe.

Genetisch kodierbar sind die folgenden L-Aminosäuren:

Gly, Ala, Ser, Thr, Val, Leu, Ile, Asp, Asn, Glu, Gln, Cys,
Met, Arg, Lys, His, Tyr, Phe, Trp, Pro (neutrale Aminosäuren
unterstrichen.

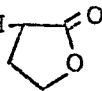
5

Unter einer neutralen Aminosäure versteht man dann insbeson-
dere Gly, Ala, Ser, Thr, Val, Leu, Ile, Asn, Gln, Met, Phe
oder Pro; unter einer basischen Aminosäure versteht man
insbesondere Arg, Lys oder His.

10

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren lassen sich beispiels-
weise folgende Insulin-Derivate herstellen (ohne daß die
Erfindung auf diese beschränkt wäre):

- 15 Humaninsulin-Arg^{B31}-OH
Schweineinsulin-Arg^{B31}-OH
Rinderinsulin-Arg^{B31}-OH
Humaninsulin-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH
Schweineinsulin-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH
20 Rinderinsulin-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH
Humaninsulin-Lys^{B31}-OH
Humaninsulin-Ala^{B31}-Lys^{B32}-OH
Humaninsulin-Val^{B31}-Arg^{B32}-OH
Humaninsulin-Leu^{B31}-Arg^{B32}-Arg^{B33}-OH
25 Schweineinsulin-Val^{B31}-His^{B32}-Arg^{B33}-OH
Schweineinsulin-Leu^{B31}-Val^{B32}-Arg^{B33}-OH
Humaninsulin-Arg^{B31}-Phe^{B32}-OH
Humaninsulin-Arg-NH-



- 30 Das erfindungsgemäße Verfahren wird bevorzugt im pH-Bereich
von einer pH-Einheit unterhalb des isoelektrischen Punktes
bis einer Einheit oberhalb dieses Punktes in der Gegenwart
eines Phenols oder eines Gemisches mehrerer Phenole durch-
geführt.

- 35 Zur Einstellung des pH-Wertes können geeignete Puffer (wie
Acetate, Citrat oder Phosphat) verwendet werden.

Bevorzugt wird nach dem erfindungsgemäßen Verfahren die
Reaktion so geführt, daß die Konzentration des Ausgangsma-
terials 0,5 - 30 mg/ml, vorzugsweise 1-10 mg/ml beträgt und

die Reaktionsgeschwindigkeit geringfügig größer oder gleich ist wie die Bildungsgeschwindigkeit der Kristalle. Auf diese Weise wird erreicht, daß viele Kristallkeime entstehen und damit die Kristallgröße mit Mittel 30 μ m nicht übersteigt.

- 5 Die Reaktionsgeschwindigkeit kann vor allem bei Enzymkatalyse sehr genau in der gewünschten Weise kontrolliert werden.

Mit dem beschriebenen Verfahren ist es also möglich, die Reaktion besser in Richtung auf das gewünschte Produkt zu
10 lenken und damit die Ausbeute deutlich zu verbessern. Das Produkt fällt in einer leicht weiter zu verarbeitender Form an, die von überschüssigen Spaltungsreagens z.B. Proteasen durch einfaches Waschen weitgehend befreit werden kann.

- 15 Als Spaltungsreagenz wird beispielsweise eine Protease gewählt, deren Spezifität so ist, daß der gewünschte Rest X_n erhalten bleibt, während die A-Kette nach erfolgter Spaltung einen freien N-Terminus H-Gly aufweist. Werden in der Proinsulinsequenz Methionine an den entsprechenden Stellen einge-
20 führt, so kann die Spaltung mit Bromcyan erfolgen, wobei C-terminal der Homoserinlactonrest erhalten bleibt.

Insulin-Derivate der Formel I und diesen enthaltende pharmazeutische Mittel stellen vollkommen neue Verzögerungsprin-
25 zipien dar, die ohne Depot-Hilfsstoffe, wie Zink oder Protaminsulfat, zur Wirkung gebracht werden können. Die Depot-Wirkung geht auf ein inhärentes, proteinchemisch bedingtes physikalisches Prinzip, die Schwerlöslichkeit des Insulin-Derivats am isoelektrischen Punkt, zurück. Seine
30 Wiederauflösung unter physiologischen Bedingungen wird möglicherweise durch Abspaltung der zusätzlichen basischen Gruppen erreicht, die je nach Derivat durch tryptische oder Trypsin-ähnliche, und/oder Carboxypeptidase B- oder Carboxypeptidase B-ähnliche und/oder Esterase-Aktivität zustande
35 kommt.

Beispiel 1

Tryptische Verdauung von Desnonapeptid-Proinsulin vom Schwein in Abwesenheit und in Gegenwart von Phenol.

- 350 mg Desnonapeptid-Schweineproinsulin wurden sauer gelöst und zu 215 ml 0,1 M Tris-Puffer pH=7,5 gegeben, der 200 μ g Trypsin (Rind) enthält. Innerhalb weniger Minuten trat eine Trübung auf. Nach beendeter Reaktion (ca. 1 h)
- 5 wurde 100 μ g Trypsin-Inhibitor zugegeben, zentrifugiert, der weiße Niederschlag in 20 ml 0.05 M Ammoniumacetatpuffer pH = 4,0 mit 0,1 % eines geeigneten Detergens gelöst und am Kationenaustauscher mit einem 0 bis 1 M Kochsalzgradienten gereinigt. Es wurden isoliert: 96 mg (36,6 %) Insulin-Arg^{B31}
- 10 -Arg^{B32}-OH in reiner Form und 72 mg (27,4 %) eines Gemischs aus Insulin-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH und Insulin-Arg^{B31}-OH und mindestens zwei weiteren Verunreinigungen (nach isoelektrischer Fokussierung und Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)). Aus dem Überstand der Reaktion wurden 56 mg
- 15 (ca. 21 %) eines Gemischs mit 14,9 % Ausgangssubstanz, 8,7 % Di- und Monoarginin-Derivat, 49,3 % Des-Alanin(B30)-Insulin und 12,2 % Desoctapeptid-Insulin, neben einigen kleineren, unidentifizierten Peaks (HPLC) isoliert.
- 20 In einem Parallelansatz wurden 100 mg Desnonapeptid-Schweineproinsulin sauer gelöst, und zu 50 ml eines 0,1 M Tris-Puffers pH=7,5 gegeben, der 2,5 mg/ml m-Kresol und 50 μ g Trypsin (Rind) enthielt. Nach etwa 15 Minuten bildete sich ein kristalliner Niederschlag aus scharfkantigen Prismen von ca.
- 25 5 - 15 μ m Größe. Die Reaktion wurde nach 3 h in der beschriebenen Weise abgebrochen. Die Aufarbeitung erfolgte wie oben.

Ausbeuten: 56 mg (74,7 %) Insulin-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH

30 11 mg (14,7 %) Gemisch aus Di-Arginin- und Mono-Arginin-Derivat

Im Überstand befindet sich nur noch eine Spur an Insulin-ähnlichen Substanzen.

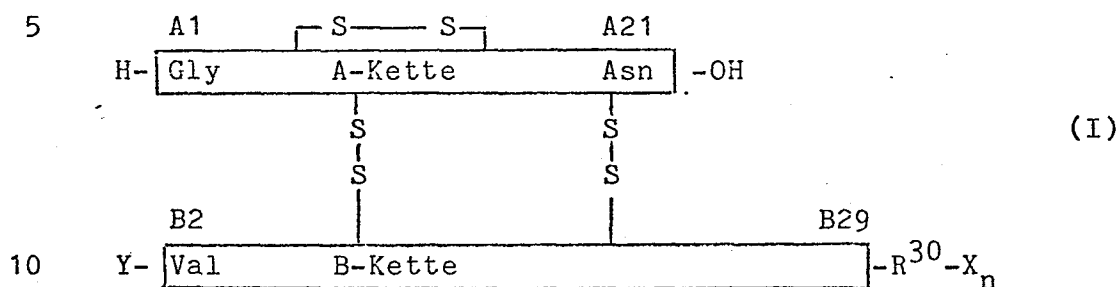
Beispiel 2

Herstellung von Humaninsulin-Arg^{B31}-OH aus Affen-Präproinsulin, exprimiert in E.coli, durch tryptische Verdauung.

- 5 10 mg Affen-Präproinsulin werden sauer gelöst und zu 5 ml 0,1 M Phosphatpuffer mit 0,5 M Kochsalz pH = 6,8, der 1,5 mg/ml Phenol und 0,7 mg/ml m-Kresol, sowie 25 µg Trypsin (Rind) enthält, zugegeben. Aus der Reaktionslösung
- 10 fällt das gewünschte Produkt in scharfkantigen Prismen von ca. 5-20 µm Größe aus. Die Kristalle enthalten 92 % an Insulin und Insulin-Derivaten davon nach HPLC 78 % Humaninsulin-Arg^{B31}-OH und 14 % Humaninsulin-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH. Im klaren Überstand der Reaktion wird nur weniger als 5 % an
- 15 Insulin-ähnlichem Protein gefunden. Läßt man die Kristallsuspension in Gegenwart von Trypsin noch weitere 2 Tage bei Raumtemperatur stehen, so befinden sich noch immer 87 % der theoretischen Insulin- und Insulin-Derivat-Menge im kristallinen Zustand, davon 79 % Humaninsulin-Arg^{B31}-OH und 11 %
- 20 Humaninsulin-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Insulin-Derivaten der Formel I,



in welcher

R^{30} für den Rest einer neutralen, genetisch kodierbaren

15 L-Aminosäure steht,

X für gleiche oder verschiedene Reste genetisch kodierbarer L-Aminosäuren steht, darunter mindestens eine basische Aminosäure, wobei das C-terminale Glied Homoserinlacton sein kann,

20 Y Phe oder H,

n = 1, 2 oder 3 bedeutet, durch Spaltung von Intermediaten, Proinsulin, Präproinsulin oder deren Analogen, dadurch gekennzeichnet, daß die Spaltreaktion in der Nähe des isoelektrischen Punktes der Insulin-Derivate der Formel I in Gegenwart einer aromatischen Hydroxyverbindung durchgeführt wird.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß R^{30} in der Formel I für Ala, Thr oder Ser steht.

30

3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß Y in Formel I für Phe steht.

35

4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Insulin-Derivat der Formel I die Sequenz des Humaninsulins, des Schweineinsulins oder des Rinderinsulins besitzt.

40

5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß X in Formel I für einen neutralen und/oder basischen Aminosäurerest steht.

6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Spaltreaktion in Gegenwart von einem Phenol oder eines Gemisches mehrerer Phenole durchgeführt wird.

5

7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktionsgeschwindigkeit so gewählt wird, daß bevorzugt das Reaktionsprodukt in Form von bis zu 30 μ m großen Kristallen anfällt.

10

8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß zu Beginn der Reaktion das Intermediat, das Proinsulin oder deren Analoges in einer Konzentration von 0,5 bis 30 mg/ml im Reaktionsmedium vorliegen.

15

9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Reaktionsmedium ein wäßriges, in geeigneter Weise gepuffertes Medium darstellt.

- 20 10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Spaltungsreagenz eine Protease darstellt, deren Spezifität so ist, daß der gewünschte Rest X_n erhalten bleibt, während die A-Kette nach erfolgter Spaltung einen freien N-Terminus aufweist.

25

11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Spaltungsreagenz Bromcyan darstellt, wodurch am C-Terminus der B-Kette der Homoserinlactonrest erhalten bleibt, während bei der Spaltung an Met-AO der natürliche N-Terminus der A-Kette entsteht.

30